

CATIONIC LIPOSOMES**Publication number:** JP2003528131 (T)**Publication date:** 2003-09-24**Inventor(s):****Applicant(s):****Classification:**

- international: C12N15/09; A61K9/12; A61K9/127; A61K31/7088; A61K31/711; A61K47/18; A61K47/36; A61K47/44; A61K47/48; A61K48/00; A61P5/00; A61P37/00; A61P43/00; B01J13/04; C12N5/10; A61K9/00; C12N15/09; A61K9/12; A61K9/127; A61K31/7088; A61K31/711; A61K47/16; A61K47/36; A61K47/44; A61K47/48; A61K48/00; A61P5/00; A61P37/00; A61P43/00; B01J13/04; C12N5/10; A61K9/00; (IPC1-7): C12N5/10; A61K48/00; A61K9/12; A61K9/127; A61K31/7088; A61K31/711; A61K47/18; A61K47/36; A61K47/44; A61K47/48; A61P5/00; A61P37/00; A61P43/00; B01J13/04; C12N15/09

- European: A61K9/127B; A61K9/127B2

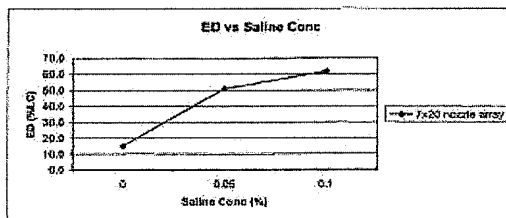
Application number: JP20010570244T 20010329**Priority number(s):** US20000193062P 20000329; WO2001US10523 20010329**Also published as:**

WO0172283 (A1)
EP1267834 (A1)
CA2402613 (A1)
AU4792401 (A)

Abstract not available for JP 2003528131 (T)

Abstract of corresponding document: **WO 0172283 (A1)**

The cationic liposomal formulations of the present invention provide nucleic acid and gene product delivery devices having a glycosaminoglycan covalently attached to the liposome surface. The glycosaminoglycan can be any glycosaminoglycan, including but not limited to hyaluronic acid, the chondroitin sulfates, keratan sulfate, chitin and heparin. Preferably, the glycosaminoglycan is hyaluronic acid. The present invention also provides methods of preparing the nucleic acid-liposome formulations.



Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号
特表2003-528131
(P2003-528131A)

(43) 公表日 平成15年9月24日 (2003.9.24)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
A 6 1 K 48/00		A 6 1 K 48/00	4 B 0 2 4
9/12		9/12	4 B 0 6 5
9/127		9/127	4 C 0 7 6
31/7088		31/7088	4 C 0 8 4
31/711		31/711	4 C 0 8 6
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 39 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2001-570244(P2001-570244)
(86) (22) 出願日 平成13年3月29日 (2001.3.29)
(85) 翻訳文提出日 平成14年9月26日 (2002.9.26)
(86) 国際出願番号 PCT/US 01/10523
(87) 国際公開番号 WO 01/072283
(87) 国際公開日 平成13年10月4日 (2001.10.4)
(31) 優先権主張番号 60/193,062
(32) 優先日 平成12年3月29日 (2000.3.29)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

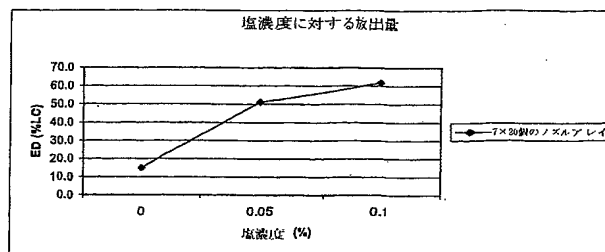
(71) 出願人 アラダイム コーポレーション
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ヘイ
ワード ポイント エデン ウェイ 3929
(72) 発明者 ゴンダ イゴ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サン
フランシスコ ラーキン ストリート
2351
(72) 発明者 マーガレット リモーナ
イスラエル国 テル アビブ ルーム
511 シャーマン ビルディング デパー
トメント オブ バイオケミストリー
(74) 代理人 弁理士 清水 初志 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 カチオン性リボソーム

(57) 【要約】

本発明のカチオン性リボソーム製剤は、リボソーム表面に共有結合したグリコサミノグリカンを含む、核酸および遺伝子産物の送達装置を提供する。グリコサミノグリカンは、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸、キチンおよびヘパリンを非制限的に含む、任意のグリコサミノグリカンでありうる。好ましくは、グリコサミノグリカンはヒアルロン酸である。本発明はまた、核酸リボソーム製剤の調製方法も提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 哺乳動物細胞に核酸をトランスフェクトするための組成物であって、

核酸；

リポソームを形成する、カチオン性脂質を含むカチオン性脂質組成物；および
グリコサミノグリカン；

を含み、

グリコサミノグリカンがリポソームの表面と共有結合しており、さらに核酸が
(a) 内因性核酸とハイブリダイズしてその発現を阻害する能力、および (b) 活性のある遺伝子産物へと転写される能力、からなる群より選択される活性を有する、組成物。

【請求項2】 カチオン性脂質が多価カチオン性脂質である、請求項1記載の組成物。

【請求項3】 グリコサミノグリカンが、コンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸、キチンおよびヘパリンからなる群より選択される、請求項1記載の組成物。

【請求項4】 グリコサミノグリカンがヒアルロン酸である、請求項1記載の組成物。

【請求項5】 カチオン性脂質組成物が中性脂質をさらに含み、該カチオン性脂質組成物が肺胞界面活性物質蛋白質をさらに含む、請求項1記載の組成物。

【請求項6】 カチオン性脂質をグリコサミノグリカンと連結する架橋物質をさらに含む、請求項1記載の組成物。

【請求項7】 第2の細胞表面分子と結合する第2の分子をさらに含み、第2の分子がリポソームの表面と共有結合しており、第2の分子が細胞表面受容体と特異的に結合するリガンドである、請求項1記載の組成物。

【請求項8】 哺乳動物細胞をトランスフェクションする方法であって、
哺乳動物細胞表面と選択的に結合する能力を特徴とする、核酸、カチオン性脂質およびグリコサミノグリカンを含む組成物を哺乳動物細胞に投与する段階；ならびに

核酸を細胞内に移行させる段階

を含む方法。

【請求項9】 核酸が遺伝子産物をコードする、請求項8記載の方法。

【請求項10】 核酸がアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項8記載の方法。

【請求項11】 核酸が少なくとも1つのコード領域を含む高分子量ポリヌクレオチドである、請求項8記載の方法。

【請求項12】 哺乳動物細胞に核酸をトランスフェクトするための組成物を作製するための方法であって、

多価カチオン性脂質および核酸を含むカチオン性脂質組成物を配合する段階；
核酸を封入するためにカチオン性脂質組成物からカチオン性のリポソームまたは小胞を形成する段階；ならびに

グリコサミノグリカンのカチオン性リポソームの表面に共有結合させる段階を含む方法。

【請求項13】 請求項12記載の方法によって作製されるトランスフェクション用組成物。

【請求項14】 核酸を哺乳動物細胞に送達するための方法であって、細胞を請求項1記載の組成物と接触させることを含む方法。

【請求項15】 核酸をインビボの哺乳動物細胞に導入する、請求項14記載の方法。

【請求項16】 細胞がヒト細胞である、請求項15記載の方法。

【請求項17】 細胞が肺細胞であり、被験者に対する組成物の肺送達を介して組成物を細胞に投与する、請求項15記載の方法。

【請求項18】 組成物を肺細胞に対する投与の前にエアロゾル化する、請求項17記載の方法。

【請求項19】 組成物のグリコサミノグリカンがHAであり、哺乳動物細胞がHAと特異的に結合する細胞表面分子を含む、請求項15記載の方法。

【請求項20】 細胞表面分子がCD44である、請求項19記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

技術の分野

本発明の分野は一般に、核酸との複合体形成のためのカチオン性リポソームの使用を対象とする。このような複合体は、核酸および／または遺伝子産物を細胞に導入するために用いられうる。

【0002】

発明の背景

外来遺伝子のインビトロおよびインビボでの送達および発現のために、数多くの方法が用いられてきた。これらには、化学的方法（リン酸カルシウム沈殿、DEAE-デキストラン、ポリブレン、中性またはアニオン性のリポソーム、カチオン性リポソームおよび標的化されたポリリジン結合物など）、物理的方法（微量注入法、電気穿孔法および遺伝子銃法）および生物的方法（ウイルスベクター）が含まれる（Felgner (1993) J. Liposome Res., 3: 3~16）。

【0003】

実際的にみて、理想的な遺伝子送達ベクターは以下の特徴を備えているべきである：（1）DNAを保護して細胞内に効率的に送達すること、好ましくは特定の細胞種に対する特異性がある；（2）毒性がなく免疫原性がないこと；および（3）大量生産が容易であること。現在に至るまで、これらの条件をすべて満たすベクター系は存在しない。

【0004】

例えば、アデノウイルスは遺伝子導入に関して効率の優れたベクターであり、さまざまな種類の細胞を一過的に感染させることができる。遺伝子操作されたアデノウイルスは宿主にとって比較的安全と考えられている（Rosenfeldら（1992）Cell, 68: 143~155；Engelhardtら（1994）Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 6196~6200）。他の組換えウイルスベクターと比べて、アデノウイルスは大量生産が比較的容易である。しかし、最近の前臨床試験および臨床試験で、その免疫原性に関して重大な懸念が提起されている。宿主における、治療に関連した炎症、中和抗体の産生およびウイルス特異的細胞傷害性Tリンパ球（CTL）反応は、

このウイルスベクターを高用量で用いること、または反復投与を行うことの妨げになる場合がある (Crystalら (1994) *Nature Genetics*, 8: 42~51)。

【0005】

レトロウイルスおよびアデノ随伴ウイルス (AAV) は、分裂細胞および分裂しないと考えられる細胞に対する効率的および安定的なトランスフェクションを媒介する (Miller (1990) *Hum Gene Ther*, 1: 5; Kotin (1994) *Hum Gene Ther*, 5: 793~801)。しかし、いずれの系もウイルス価が比較的低いことが大きな技術的限界となっている。

【0006】

安全性に関する懸念、および組換えウイルスベクターを大量に入手することの困難さのために、効率的で、免疫原性がないまたはほとんどなく、調製が容易な非ウイルス性ベクター系の探索が促された。中でも、カチオン性リポソームおよび標的化されたポリリジン結合物は最も有望である (Felgnerら (1991) *Nature*, 349: 351~352; Curielら (1991) *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 8850~8854)。

【0007】

リポソーム核酸の送達方法は数多く記載されている。米国特許第5, 908, 635号は、遺伝子治療用のカチオン性リポポリアミンおよび中性脂質のリポソーム調製物を記載している。米国特許第5, 908, 777号は、核酸を核酸/ポリカチオン複合体の形に濃縮し、続いてアニオン性脂質調製物と複合体形成して脂質ベクターを形成させることによる、核酸送達用の脂質ベクターの作製方法を記載している。米国特許第5, 783, 566号は、膜結合プロテオグリカンの量を調節し、選択的にグリコサミノグリカンの血漿中濃度を調節することにより、カチオン性分子種と遺伝物質との複合体によって媒介されるトランスフェクションの効率を調節するための方法を記載している。米国特許第5, 827, 703号は、DNA発現カセット用カチオン性脂質およびコレステロールを含む脂質担体の使用を記載している。

【0008】

リポソームを用いる方法は数多く存在するが、遺伝子治療に用いられる上記のカチオン性リポソームDNA構築物には、毒性、免疫原性、マクロファージによる

食作用、標的化能力がないことを含め、重大な欠点が多い。さらに、肺への送達に用いた場合、このような構築物は粘液線毛クリアランスを受けやすい。

【0009】

したがって、核酸および遺伝子産物の送達のための改良されたリポソームに対する需要が存在する。本発明は、この需要および他の需要に対処するものである。

【0010】

発明の概要

本発明のカチオン性リポソーム製剤は、(1) 標的細胞に対する生体接着性 (b ioadhesivity)、(2) 低い免疫原性、例えば、マクロファージ食作用に対する耐性、および (3) リポソーム表面のカチオン性脂質の「マスキング」(この結果、リポソームの性質は、異物としてではなく部分的または完全に自己として認識されるように変化する) を特徴とする、核酸および遺伝子産物の送達装置を提供する。本発明の生体接着性カチオン性リポソームは、リポソーム表面に共有結合したグリコサミノグリカンを含む。グリコサミノグリカンは、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸、キチンおよびヘパリンを非制限的に含む、任意のグリコサミノグリカンでありうる。好ましくは、グリコサミノグリカンはヒアルロン酸である。本発明はまた、核酸-リポソーム製剤の調製方法も提供する。

【0011】

本発明の生体接着性カチオン性リポソーム送達装置は、核酸および／または遺伝子産物を細胞内に導入するための手段を提供し、これにより、さまざまな目的で細胞に産物を投与するための方法を提供する。これらの送達装置は、医薬製剤として、すなわち賦形剤担体とともに投与することができる。本発明は、全身投与に有用な核酸の送達のための医薬用リポソーム製剤を提供し、分裂細胞における所定の遺伝子の長期的発現を提供する。

【0012】

生体接着性カチオン性リポソームは任意の通常の経路を介して投与可能であるが、1つの好ましい態様では、それらはエアロゾル化され、肺を介した経路によ

って送達される。

【0013】

1つの態様において、カチオン性リポソームは、カチオン性リポソームと共有結合した少なくとも2つの生体分子、すなわちグリコサミノグリカン、およびリポソームを特定の細胞種に指向させるもう1つの分子、例えば、HER-2またはFGFRなどの膜貫通型受容体と選択的に結合するリガンド（例えば、ホルモン）を有する。

【0014】

本発明の1つの目的は、核酸または遺伝子産物を細胞内に導入するための生体接着性高分子を提供することである。

【0015】

本発明のもう1つの目的は、細胞にインビボで投与した場合に免疫原性がないリポソーム製剤を提供することである。

【0016】

本発明のさらにもう1つの目的は、標的細胞表面での濃度および滞留性の高いリポソーム製剤を提供することである。

【0017】

利点の1つは、生体接着性カチオン性リポソームが、細胞内への核酸の導入を促進する生体接着性を示すことである。

【0018】

さらにもう1つの利点は、生体接着性カチオン性リポソームにマクロファージによる食作用に対する耐性があることである。

【0019】

さらにもう1つの利点は、グリコサミノグリカンがリポソーム表面に存在することにより粒子表面のカチオン性脂質をマスキングすることである。

【0020】

本発明の上記および他の目的、利点および特徴は、ここに記載する本発明の詳細を読むことによって当業者に明らかになると考えられる。

【0021】

好ましい態様の詳細な説明

本発明のリポソームの作製方法、さまざまな医学的状態の治療のためのこれらの送達、これらとともに用いる装置および製剤について説明する前に、本発明が特定の方法、装置および製剤には限定されず、従ってこれらは当然ながら異なってもよいことが理解される必要がある。また、本明細書で用いる用語は特定の態様のみを説明することが目的であり、本発明の範囲を制限することは意図しておらず、これは添付する特許請求の範囲のみによって制限されることも理解される必要がある。

【0022】

本明細書および添付する特許請求の範囲において用いる場合、単数形の「1つの(a)」 「1つの(an)」 および「その(the)」 は、その文脈で別の指示が明らかになされない限り、複数のものに関する言及も含むことに留意しなければならない。したがって、例えば、「1つの製剤」 に対する言及は複数の異なる製剤の混合物を含み、「1つの類似体」 に対する言及は1つの類似体または複数の類似体の混合物を含み、「治療方法」 に対する言及は当業者に知られた等価の手順および方法に関する言及を含み、その他も同様である。

【0023】

別に定義する場合を除き、本明細書で用いるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する当業者が一般に理解しているものと同じ意味を持つ。本発明の実施または検討のために本明細書に記載したものと同様または同等の方法、装置および材料を用いることができるが、好ましい方法、装置および材料は以下に説明するものである。本明細書で言及するすべての刊行物は、その刊行物に記載され、今回説明する発明と関連して用いられる可能性のある装置、製剤および方法の開示および記載を目的として、その全体が参照として本明細書に組み入れられる。

【0024】

本明細書で用いる「核酸」または「ポリヌクレオチド」という用語は、別に指示する場合を除いて互換的とみなし、これにはDNA、RNA、またはDNAとRNAとの混合物が含まれる。本発明に係る核酸には、任意の鎖構造体、例えば、一本鎖、二

本鎖もしくは三本鎖ポリヌクレオチド構造体、またはそれらの混合物も含まれる。また、核酸には、直線状または環状の構造体、例えば、プラスミド、ファージミド、コスミドなども含まれる。

【0025】

本明細書で用いる「遺伝子産物」という用語は、本発明の方法を用いて細胞内または細胞に対して導入された核酸から生じたオリゴペプチド、ペプチドまたは蛋白質のことを指す。

【0026】

「治療」「治療すること」などの用語は、本明細書では一般に、望ましい薬理学的および／または生理学的効果を得ることを意味する。この効果は疾患もしくはその症状を完全もしくは部分的に防止する点で予防的であってもよく、ならびに／または、疾患および／もしくはその疾患に起因する有害効果を部分的または完全に治癒させる点で治療的であってもよい。1つの態様において、本明細書で用いる「治療」は、哺乳動物、特にヒトにおける疾患の任意の治療を含み、これには、

(a) 疾患に罹りやすい可能性はあるが、まだそれを有するとは診断されていない被験者における疾患の発生を予防すること；

(b) 疾患を阻止すること、すなわちその発症を停止させること；または

(c) 疾患を緩和すること、すなわち疾患を緩解させること、が含まれる。本発明は、炎症などの細胞遊走が関与する生物プロセスに関して患者を治療することを目指し、特に癌細胞の転移を治療することを目指す。もう1つの態様において、本明細書で用いられる「治療」という用語は、卵母細胞の受精などの通常の生物プロセスを阻害または増強するための任意の使用を含む。

【0027】

「単離された」という用語は、蛋白質がその自然な環境から分離されていることを意味する。しかし、それに付随して認められる化合物のいくつかは、依然として「単離された」蛋白質とともに存在し続けてもよい。したがって、「単離された蛋白質」は、自然界にみられるものと同じではないが、純度が実質的には100%未満の蛋白質であってもよい。

【0028】

本明細書で用いる「グリコサミノグリカン」という用語は、炭水化物を含む高分子のことを指し、これにはグリコサミノグリカンとして知られたものも、まだ同定されていないものも含まれる。本発明に用いるためのグリコサミノグリカンのサイズはさまざまによく、硫酸化されたものでも硫酸化されていないものでもよい。本発明の阻害剤および方法を用いて標的化されうるグリコサミノグリカンには、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸、キチンおよびヘパリンが非制限的に含まれる。

【0029】

「特異的に結合する」とは、リポソームの特異的な細胞表面分子との高い結合活性および／または高親和性での結合、例えば、リポソームのグリコサミノグリカンがCD44などの細胞表面分子と結合することを指す。リポソームの特異的な細胞表面分子との結合は、同じリポソームの細胞表面にある他の蛋白質との結合、または同じリポソームの他の細胞、特に標的細胞と同じ領域に存在する可能性のある他の細胞の表面にある関連するが異なる蛋白質との結合よりも強いことが好ましい。細胞と特異的に結合するリポソームが、他の細胞表面分子と弱いながらも検出可能なレベル（例えば、標的細胞表面分子に関して示された結合の10%またはそれ未満）で結合可能であってもよい。このような弱い結合、またはバックグラウンドの結合は、例えば適切な対照を用いることにより、関心対象の特異的な結合とは容易に区別することができる。

【0030】

発明の一般的な局面

本発明は、リポソームの内部に含まれる、および／またはそれに付随する核酸の特定の細胞集団への送達効率を高めることを目的として、種々の生体接着性分子をリポソームに効果的に結合させる効率の良い方法を提供する。本発明のリポソーム送達系は、グリコサミノグリカンをリポソーム表面に結合させ、それによって生体接着性リポソームを形成させることによって作製される。本発明の生体接着性リポソームは、指定した標的領域に対する特異性およびそれに対する接着能を有しており、ひとたび標的に接着すればリポソームの治療用内容物の徐放が

得られると考えられる。

【0031】

本発明の改良された工程は、生体接着性分子をリポソームに添加すること；架橋試薬をリポソームと生体接着性分子との混合物に添加すること；および混合物を一定期間インキュベートして生体接着性リポソームを形成させること、を含む。ある種の生体接着性分子をリポソーム表面に共有結合させることによって通常のリポソームを改変することにより、生体接着性分子を、細胞動態および流体力学とは無関係に改変リポソームを標的領域に付着および保持させるための接着剤または粘着剤として利用することができる。形成される生成物は、核酸を含む治療薬を含みうる、またはそれと付随しうる、複数のリポソーム-架橋物質-生体接着性分子複合体を含む。核酸は内因性蛋白質の発現を阻害するものでもよく（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）、治療的な遺伝子産物をコードおよび発現すると思われるものでもよい。

【0032】

本発明の生体接着性カチオン性リポソームは、HAと特異的に結合するCD44などの細胞表面分子を有する細胞を標的とする薬剤として用いることができる。これらの生体接着性カチオン性リポソームには、核酸およびその結果生じる遺伝子産物のインビボでの細胞への導入に関して、数多くの利点がある。

【0033】

第1に、これらの分子は、トランスフェクション効率を改善し、用量の減らすことを可能にする生体接着性を示す。グリコサミノグリカンハリポソームの細胞膜との結合を促進し、細胞への移行を促進する。これは標的細胞でのリポソーム濃度を高めるだけでなく、標的細胞での滞留時間の改善ももたらす。リポソームを肺を介した経路によって送達した場合には、粘液線毛クリアランスに起因して滞留時間も長くなる。

【0034】

第2に、生体接着性カチオン性リポソームは、マクロファージ食作用に対して耐性があるため、免疫応答に対する耐性の改善を示す。このことは、他のリポソーム送達装置に比べて、マクロファージを介したクリアランスの減少をもたらす

。加えて、これらのリポソームに対する初期免疫応答が阻害されるため、免疫原性および毒性も低下する。免疫原性および毒性のこの低下は用量依存的である。

【0035】

第3に、リポソーム表面にグリコサミノグリカンが存在することによって粒子表面のカチオン性脂質がマスキングされ、このためにリポソームが異物としてではなく、部分的に自己または自己としてインビボで認識される。

【0036】

本発明のリポソーム送達装置の上記および他の利点は、従来の非ウイルス性核酸送達法の欠点の多くを克服する。加えて、この送達装置には、核酸および遺伝子産物をインビボで細胞に導入する物理的またはウイルス的手段に伴う多くの欠点がない。

【0037】

送達用の核酸構築物

本方法に従ってリポソーム架橋物質-生体接着性分子内に封入しうる、または他の形で付随させることができる核酸には、センスまたはアンチセンスポリヌクレオチドが含まれうる。例えば、用いるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的DNAの発現を選択的に阻害するものでもよい。例えば、ウイルス配列に対して相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを封入し、肝炎、AIDSウイルス感染、パピローマウイルス感染などの抗ウイルス治療に用いてもよい。遺伝子治療のためのアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用は文献中に記載されている。スタイン (Stein) およびチャン (Chang) (1993) *Science* 261:1004を参照のこと。また、リポソームRNAを封入し、遺伝子発現の研究または遺伝子治療のために用いてもよい。

【0038】

1つの態様において、本発明は、高分子量ポリヌクレオチド分子の効率的な封入を提供する。本明細書で用いる「高分子量」ポリヌクレオチドとは、ポリヌクレオチドが宿主細胞内に導入される場合に転写されうるような、少なくとも1つのコード配列を含むポリヌクレオチド分子のことを指す。この転写によってmRNA分子が生じ、これが続いて翻訳されてポリペプチドもしくは蛋白質が産生される

ことができ、またはこれがアンチセンスRNA分子を生成することができる。HMWポリヌクレオチドのコード配列の転写はエンハンサー配列、オペレーター配列などのシス作用性調節配列の制御下にあることが好ましく、ポリヌクレオチドはリボソーム結合部位、開始コドンならびに転写終結シグナルおよびポリアデニル化シグナルも含む。このため、本明細書で用いるHMWポリヌクレオチドの定義は一般に、このような調節配列を含むポリヌクレオチドを意味するものと解釈される。HMVポリヌクレオチドが、トランスフェクションに用いるポリヌクレオチドに一般に認められる複製起点などの他の要素を含んでいてもよい。

【0039】

本発明は、安定的なエピソームの維持を許容する配列がその中に機能的に組み入れられたもの、および多重遺伝子カセットをコードするものを含む、大規模ベクターの効率的な封入を提供する。望ましい核酸を宿主細胞のゲノムに組み込むことはトランスフェクション工程に負の影響を及ぼすことがあるため、これはエピソーム構築物の場合に重要である。多重遺伝子カセットに関しても、コードされる遺伝子の協調的調節がより容易に実現可能となるため、これは重要である。

【0040】

本方法に従って封入される核酸のサイズは、約500塩基という小さなものから約50キロベースまでの範囲に及ぶと思われる。1つの好ましい態様において、封入される核酸は約1.0～25kB、好ましくは約5～約18kBの範囲のDNAを含むと考えられる。

【0041】

1つの好ましい態様において、封入される核酸はエピソーム要素、例えば、標的細胞において発現させようとする1つまたは複数の遺伝子を含むプラスミドを含むと考えられる。宿主細胞の複製機能によって認識される複製起点を含むエピソーム要素は、染色体外要素として細胞内に安定的に維持され、そのために、該要素にコードされた遺伝子の安定的な発現が可能になると考えられる。一般にこれらの遺伝子は、標的細胞が異種発現産物を生成する原因、または変化した表現型を獲得する原因になると考えられる。エピソーム要素が宿主細胞によって認識される複製起点を含まなければ、発現産物は一過的にしか生成されないと考えら

れる。

【0042】

以上に考察した通り、封入される核酸にはDNA、RNAまたはそれらの混合物が含まれ、さらに直線状および環状の構造体が含まれる。また、封入される核酸は一本鎖でも多重鎖でもよく、センスまたはアンチセンス核酸配列が含まれる。1つの好ましい態様において、核酸にはサイズが約5～約18キロベースの範囲であるDNA構築物が含まれる。一般に、このようなDNA構築物は、標的細胞において発現させようとする1つまたは複数の遺伝子を含むと考えられる。また、DNA構築物は好ましくは、必要に応じてこれらのDNA構築物に標的細胞における自己複製をもたらす配列に加えて、これらの遺伝子の発現をもたらす適した調節配列、さらには抗生物質耐性マーカーなどの適した選択マーカーも含むと考えられる。一般に、これらの遺伝子は調節可能なプロモーターの制御下で発現されると考えられる。

【0043】

最も好ましい態様において、DNA構築物は、治療的または望ましい遺伝子産物を生成する、1つまたは複数の遺伝子を含むと考えられる。このような遺伝子産物の例には、治療用リンホカイン、サイトカイン、ホルモン、細胞接着分子、酵素または酵素阻害剤、受容体、イオンチャンネル、転写因子、蛋白質リン酸化酵素、蛋白質脱リン酸化酵素、および宿主における免疫応答を生じさせるための細胞抗原が非制限的に含まれる。または、DNA構築物は自殺遺伝子、腫瘍抑制遺伝子、アンチセンスRNAをコードする遺伝子、または細胞アポトーシスを誘導もしくは防止する遺伝子を含むと考えられる。

【0044】

リポソームに封入された本発明のDNA構築物によってコードさせうるリンホカインおよびサイトカインの例には、血小板由来増殖因子、上皮増殖因子、インターロイキン1～14、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、腫瘍壊死因子、白血病抑制因子、アンフィレグリン (amphiregulin)、アンジオゲニン、ベータセルリン、カルシトニン、毛様体神経栄養因子、脳由来神経栄養因子、ニュートロフィン3および4、神経成長因子、コロニー刺激因子-1

、内皮細胞増殖因子、エリスロポエチン、酸性および塩基性線維芽細胞増殖因子、肝細胞増殖因子、ヘパリン結合性EGF様増殖因子、インスリン、インスリン様増殖因子IおよびII、インターフェロン α 、 β および γ 、ケラチノサイト増殖因子、マクロファージ炎症性蛋白質 α および β 、ミッドカイン、オンコスタチンM、ランテス (RANTES)、幹細胞因子、トランスフォーミング増殖因子 α および β 、ならびに血管内皮増殖因子が非制限的に含まれる。細胞接着分子の例には、インテグリン、カドヘリン、セレクチン、ならびにVCAM、ICAM、PECAMおよびNCAMなどの免疫グロブリンスーパーファミリーの接着分子が含まれる。腫瘍抑制遺伝子の例には、p53、DCC、RbおよびMTS1が含まれる。当業者は他の遺伝子も本発明に用いられうることを認識すると考えられる。

【0045】

さらに、このDNA構築物は、構築物の細胞内での複製、さらには構築物上にコードされる遺伝子の転写および翻訳をも制御しうる調節配列を含むと考えられる。核酸のインビボ送達に用いる場合には、これらの調節配列が組織特異的であることが時に有用である。「組織特異的プロモーター」または「組織特異的転写調節配列」という用語は、標的組織の細胞において他の細胞より選択的にまたは高レベルに誘導される、または他の細胞よりも高レベルに誘導される転写調節配列、プロモーターおよび／またはエンハンサーを指す。例えば、腫瘍細胞に特異的なプロモーターには、特定の細胞種または腫瘍細胞において選択的に誘導される、または他の細胞よりも高レベルに誘導されるプロモーターが含まれる。組織特異的プロモーターは当技術分野で周知である。その例には、 α -アクチンプロモーター (Shani (1986)、Mol Cell. Biol.、6:2624)；エラスターゼプロモーター (Swiftら (1984)、Cell、38:639)； α -フェト蛋白質プロモーター (Krumlaufら (1985)、Nature、319:224~226)； β -グロビンプロモーター (Townesら (1985)、EMBO J.、4:1715)；ヒト成長ホルモンプロモーター (Behringerら (1988)、Genes Dev.、2:453)；インスリンプロモーター (Seldenら (1986)、Nature、321:545) および前立腺特異的プロモーター (Allisonら (1989)、Mol Cell. Biol.、9:2254) が含まれる。

【0046】

カチオン性リポソームの調製

一般にリポソームの調製にはさまざまな方法を用いることができ、これには例えば、ショーカ (Szoka) ら、Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467 (1980)、米国特許第4,235,871号、第4,501,728号、第4,837,028号、「教科書リポソーム (the text Liposomes)」、マーク J オストロ (Marc J. Ostro) 編、マーセル デッカー社 (Marcel Dekker, Inc.)、New York、1983、第1章、およびホープ (Hope) ら、Chem. Phys. Lip. 40:89 (1986) に記載されたものがあり、これらはすべて参照として本明細書に組み入れられる。1つの方法により、不均一なサイズの多重膜小胞が生成される。この方法では、小胞を形成する脂質を、封入しようとする核酸とともに適した有機溶媒または溶媒系に溶解し、真空下または不活性ガス中で乾燥を行って薄い脂質膜を形成させる。必要に応じて、フィルムを第三級ブタノールなどの適した溶媒中に再び溶解し、その後に凍結乾燥させて、より容易に水和される粉末状のより均一な脂質混合物を形成させてもよい。この膜を水性緩衝液で覆い、一般には15～60分間攪拌して水和させる。脂質をさらに激しい攪拌条件下で水和させることにより、またはデオキシコレートなどの可溶化界面活性剤を添加することにより、この結果得られる多重膜小胞のサイズ分布を小さなサイズの側に移行させることができる。

【0047】

例えば、リポフェクチン (Gibco BRL, Gaithersburg, Md.) は、種々の細胞系のインビトロでのトランスフェクションのため (Felgnerら (1987)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA.、84:7413～7417)、および成体マウスへの静脈内送達後の全身性遺伝子発現のため (Zhuら (1993)、Science、261:209～211) にうまく用いられている。リポフェクチンは、カチオン性脂質DOTMAすなわちN-[1-(2,3-ジオレイロキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド、およびDOP Eすなわちジオレイルホスファチジルエタノールアミンを1:1のモル比で用いて生成される。この製剤を用いて調製されたリポソームは、核酸の陰電荷とカチオン性リポソームの表面の陽電荷との静電相互作用によってDNAを自然に相互作用すると考えられている。このDNA/リポソーム複合体は組織培養細胞と融合し、機能的DNAの細胞内への送達を促進する (Felgnerら、前記)。

【0048】

ベール (Behr) ら (1989)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、86 : 6982~6986) およびバーテル (Barthel) ら (1993)、Cell Biol、12 : 553~560) は最近、DNAを培養細胞に移入するためのリポポリアミン (DOGS、スペルミン-5-カルボキシグリシンジオクタデシルアミド) の使用を報告している。リポポリアミンは、脂質と化学結合した天然ポリアミンであるスペルミンから合成される。例えば、DOGSはスペルミンおよびジオクタデシルアミドグリシン (Behrら、前記) から生成される。DOGSはカチオン性脂質層上にDNAを自然に濃縮させ、核脂質 (nucleolipidic) 粒子を形成させる。リポスペルミンによって覆われたこのDNAは高いトランスフェクション効率を示す (Barthelら、前記)。

【0049】

多価カチオン性脂質を含むカチオン性リポソームは通常、脂質を含むものよりも優れたトランスフェクション活性を示す (Behrら (1989) Proc Natl Acad Sci USA、86 : 6982~6986 ; Hawley-Nelsonら (1993) Focus、15 : 73~79)。例えば、リポフェクトアミン (LipofectAMINE) (GIBCO BRL、Gaithersburg、MD、USA) は常にリポフェクチン (Lipofectin) (GIBCO BRL) よりもトランスフェクション活性が高い (Hawley-Nelsonら、前記)。

【0050】

カチオン性脂質分子はすべて、正に荷電した頭部基、さまざまな長さのスペーサー、リンカー結合および疎水性アンカーという4つの異なる機能ドメインを含む。よく知られたカチオン性脂質の頭部基は、アミジン基を一つの例外として、さまざまな程度の置換がなされた単純または多数のアミン基を含む (Ruysschaertら (1994)、Biochem Biophys Res Commun、179 : 280~285)。アミン基は第一級アミンからメチル基またはヒドロキシエチル基の置換を有する第四級アンモニウムまでの範囲にわたる。複数の異なる種類のアミノ基が単一のカチオン性脂質に共存する場合がある (ジオクタデシルジメチルアンモニウムクロリド (DOGS) および2,3-ジオレオイロキシ-N-(2(スペルミンカルボキサミド)-エチル)-N,N-ジメチル-1-プロパンアミニウムトリフルオロアセテート (DOSPA)) (Behrら、前記 ; Hawley-Nelsonら、前記)。荷電基の数は一価から多価までさまざまである

(Felgnerら (1987)、Proc Natl Acad Sci USA、84: 7413~7417; Felgnerら (1994)、J. Biol. Chem.、269: 1550~1561; Behrら、前記; Farhoodら (1992)、Biochim. Biophys. Acta.、1111: 239~246; Gaoら (1991)、Biochim. Biophys. Res. Commun.、179: 280~285; Zhouら (1991)、Biochim. Biophys. Acta.、1065: 8~14; Roseら (1991)、Biotechniques、10: 520~525; Hawley-Nelsonら、前記; Ruyschaertら、前記; Itoら (1990)、Biochem. Intl.、22: 235~241; Leventisら (1990)、Biochem. Biophys. Acta.、1023: 124~132; Guoら (1993)、J. Liposome Res.、3: 51~70; Akaoら (1994)、Biochem. Mol. Biol. Intl.、34: 915~920)。カチオン性脂質の頭部基はリポソームとDNAとの間、およびリポソーム-DNA複合体と細胞膜または細胞の他の構成要素との間の相互作用の原因となる。この相互作用はトランスフェクション活性に極めて重要であり、治療の毒性の一因にもなることがある。特定の種類の頭部基を選択することが重要なことが、カチオン性コレステロール誘導体を用いた本発明者らの研究で示されている (Farhoodら、前記)。第三級アミノ基を有するカチオン性コレステロール化合物は、第四級アンモニウムの対応物よりも優れたトランスフェクション活性を示し、処理した細胞に対する毒性はより低いことを示している (Farhoodら、前記)。フェルグナー (Felgner) のグループによる別の研究では、N-(2,3-(ジオレオイロキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド (DOTMA) のヒドロキシエチル置換誘導体が、親化合物よりも向上したトランスフェクション活性を示している (Felgnerら (1994)、前記)。ヒドロキシエチル基の付加によって膜の水和性が高まり、リポソーム二層膜構造の安定化に役立つという仮説が提唱されている。多価頭部基を有するカチオン性脂質はDNAと結合し、DNAと一価カチオン性脂質との間で形成されるものよりも緻密度が高い複合体を形成するが、これは少なくとも一部には、多価カチオン性脂質を含むリポソームのトランスフェクション活性が高い一因であると思われる (Behrら、前記; Zhouら、前記; Hawley-Nelsonら、前記)。

【0051】

いくつかのカチオン性脂質系に関しては、スペーサーアームはトランスフェクション活性にとってそれほど重要ではないように思われる。その例には、スペー

サーを含まないカチオン性脂質であるジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド (DDAB)、ならびに、1原子のスペーサーしか含まない、1,2-ジオレオイロキシ-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン (DOTAP)、DOTMAおよびそれらの誘導体などのカチオン性脂質が含まれる。スペーサーの長さを5~8原子に延長しても、DOTAPよりも優れたトランスフェクション活性を有する類似体は得られなかった (Leventisら、前記)。一連の機能的コレステロール誘導体に対して行った本発明者らの複数の研究からも、スペーサーアームの長さは3~6原子の範囲でさまざまな長さが示された (Farhoodら、前記)。これに対して、スペーサーアームはある種のカチオン性脂質のトランスフェクション活性のための極めて重要な因子である。例えば、脂質に固定されたスぺルミン頭部基がDNAと副溝において結合するため (Leofflerら (1990) J Neurochem、54 : 1812~1815) および脂質の高いトランスフェクション活性のため (Leofflerら、前記 ; Remyら (1994) Bioconjugate Chem、5 : 647~654) には、スペーサーアームが重要である。より長いスペーサーを有するカチオン性脂質から構成されるリポソームは、粘膜組織の表面との相互作用の増強を示している (Guoら、前記)。イトウ (Ito) らによる一連のカチオン性グルタミン酸ジエステルに関する研究からは、長いスペーサー (11原子) を含むカチオン性脂質は短いスペーサー (2~6原子) を有するものよりも活性が低いように思われる (Itoら、前記)。

【0052】

リンカー結合は、カチオン性脂質の化学的安定性および生分解性を決定する重要なパラメーターである。DOTMAおよびDDABなどのカチオン性脂質はエーテルまたはC-N結合を含む。このような安定なリンカーは優れた化学的安定性をもたらすが、それらが細胞内で生分解性である可能性は低い。これらの安定な結合を含むカチオン性脂質をヒトに用いた場合の安全性には疑問があり、反復投与の場合にはなおさらである。エーテル結合を有するカチオン性脂質は生分解性が高く、このため、細胞毒性が低い (Farhoodら、前記 ; Leventisら、前記 ; Guoら、前記)。しかし、リンカーとしてエーテル結合を有するカチオン性脂質は一般に化学的に安定でない。例えば、DOPEおよびエーテル結合を有するカチオン性コレステロール誘導体から構成されるリポソームの半減期は4℃では約1日であったが、これ

では現実には用いることは難しい (Farhoodら、前記)。このため、アミドおよびカルバモイル結合などの安定ではあるが生分解性のある結合を含む、いくつかのカチオン性脂質が設計された (Farhoodら、前記 ; Gaoら、前記 ; Itoら、前記)。

【0053】

カチオン性脂質には2種類の疎水性アンカーが用いられており、その一方は脂肪鎖の対であり、もう一方はコレステロール環である。脂肪鎖は一般に単不飽和型 (オレオイル、C18) またはより短い飽和型 (C14またはC12) であり、これは生理的温度での十分な膜流動性および二重層内部での優れた脂質混合をもたらす (Felgnerら (1987)、前記 ; Felgnerら (1994)、前記 ; Itoら、前記 ; Leventisら、前記)。フェルグナー (Felgner) らは最近、飽和脂肪鎖の長さが14から16、18炭素原子へと増えるに伴い、その結果として得られるカチオン性脂質のトランスフェクション活性は徐々に低くなることを示した (Felgnerら (1994)、前記)。これに対して、2つのパルミチル鎖 (C16、飽和) または2つのオレオイル鎖 (C18、単不飽和) のいずれかを有するリポスペルミンは高いトランスフェクション活性を示し (Remyら、前記)、このことから脂質アンカーの物理的特性の重要性は多価カチオン性脂質の方が一価カチオン性脂質よりも低いことが示唆されている。

【0054】

コレステロール環も、種々の官能基を有する天然に存在し、かつ誘導体を容易に入手しうることから、有用な疎水性アンカーとして役立つ (Farhoodら、前記 ; Gaoら、前記 ; Leventisら、前記 ; Guoら、前記)。コレステロールには脂質を秩序立った充填状態に維持し、このために二分子膜に剛性を付与する能力があることが知られている。カチオン性コレステロール誘導体を含むリポソームは、培地中のイオン (Leventisら、前記) または負に荷電した粘膜表面 (Guoら、前記) などの妨害物質が存在する方が安定性が高い。これに対して、カチオン性コレステロール誘導体を有するカチオン性リポソームは、2重脂肪鎖を有するカチオン性脂質を含むカチオン性リポソームと同等な、またはそれよりも優れた融合活性を示す (Leventisら、前記)。コレステロールを基盤とするカチオン性脂質は

数多く報告されている (Farhoodら、前記 ; Gaoら、前記 ; Leventisら、前記 ; Guoら、前記)。第四級アンモニウム頭部基を有するコレステロール誘導体は弱いながらも検出可能なインビトロでのトランスフェクション活性を示した (Leventisら、前記)。この群を用いた結果から、コレステロールの第三級誘導体は活性のあるカチオン性脂質であるが、第四級誘導体はそうでないことが示された (Farhoodら、前記)。エステル結合を介してアラニンがコレステロール環に結合した別の誘導体は優れた活性を示した (Guoら、前記)。本発明者らは、優れた安定性およびトランスフェクション効率を得られるほか、生分解性であると考えられ、このため広く用いられているエーテル結合を有するカチオン性脂質よりも毒性が低い、カルバモイル結合を有する第三級アミノ誘導体 (3(N-(N', N'-ジメチルアミノエタン)カルバモイル)-コレステロール (DC-chol)) を合成するための簡便な手順を報告している (Gaoら、前記)。

【0055】

本発明における使用に適した脂質の例には、例えば、ホスファチジルコリン (天然物および合成調製されたものの両方)、ホスファチジン酸、リゾホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴ脂質、ホスファチジルグリセロール、スフィンゴミエリン、カルジオリピン、糖脂質、ガングリオシド、およびダイズリン脂質などのセレブロシドなどの、小胞またはリポソームを形成する既知の化合物が含まれる。他の適した脂質には、形成されたりポソームに望ましい特性を付与すると思われる、ステロイド、コレステロール、長鎖脂肪族アミンおよびカルボン酸などの脂肪族アミン、長鎖硫酸塩およびホスフェート、ジアセチルホスフェート、ブチル化ヒドロキシトルエン、トコフェロール、レチノールおよびイソプレノイド化合物が含まれる。

【0056】

また、ヒドロキシル基、分枝炭素鎖、環状誘導体、芳香族誘導体、エーテル、アミド、多価不飽和誘導体、ハロゲン化誘導体などの改変脂肪族部分、または炭水化物、グリコール、ホスフェート、ホスファミド、第四級アミン、硫酸、スルホン、カルボキシ、アミン、スルフヒドリル、イミダゾール基などの改変親水性部分およびこのような基の組み合わせを含む合成リン脂質を、上記の脂質と置

換または混合して本発明に用いてもよい。リポソームの調製時の使用に適した脂質は文献でよく知られており、例えば、米国特許第4,201,767号；米国特許第4,235,877号；米国特許第4,241,046号；米国特許第4,261,975号；および米国特許第4,394,448号に記載されており、これらはすべてその全体が参照として本明細書に組み入れられる。

【0057】

活性のあるカチオン性リポソーム製剤は通常、超音波処理または微小流動化によって調製される小型の単層リポソームである (Felgnerら (1987) 前記)。単なる激しい攪拌 (Felgnerら (1994)、前記) またはエタノール溶媒からの脂質の希釈 (Behrら (1989)、前記) によって調製される多重膜リポソームにも活性があることもある。カチオン性リポソームは通常、カチオン性両親媒性物質および中性の「ヘルパー」脂質であるジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE) を含む。DOPEは二層膜を形成しないカチオン性脂質が安定なカチオン性リポソームを形成するために必要である；これらには、カチオン性コレステロール誘導体 (Farhoodら (1992)、前記；Gaoら (1991)、前記)、リポポリリジン (Zhouら (1991)、前記) およびいくつかの二重鎖カチオン性表面活性剤 (Roseら (1991)、前記) が含まれる。ほとんどの二重鎖カチオン性脂質は単独でリポソームを形成でき、またはDOPEもしくは他の脂質との混合物としてリポソームを形成することができる。

【0058】

本発明は、望ましい封入効率が得られる任意の脂質または組み合わせた物の使用を含み、これは一般に、封入のために用いた核酸の初期量の少なくとも約25%である。1つの好ましい態様において、封入効率は好ましくは少なくとも50%であり、より好ましくは70%、さらにより好ましくは約70%～約90%の範囲であると考えられる。

【0059】

リポソームの調製後に、望ましいサイズの範囲、およびリポソームのサイズの比較的狭い分布が実現されるようにリポソームのサイズ調整を行ってもよい。サイズの範囲が約0.2～0.4ミクロンであれば、通常のフィルター、一般に0.22ミク

ロンのフィルターを通過させる濾過によってリポソーム懸濁液を滅菌することができる。リポソームのサイズを約0.2~0.4ミクロンまで小さくできれば、フィルターによる滅菌法を高スループットな形式で行うことができる。

【0060】

リポソームのサイズを望ましいサイズに調整するために用いられうる技術はいくつかある。サイズ調整法の一つは米国特許第4,737,323号に記載されており、これは参照として本明細書に組み入れられる。リポソーム懸濁液に水浴中での超音波処理またはプローブによる超音波処理を行うことにより、サイズが徐々に小さくなり、最終的には約0.05ミクロン未満のサイズの小型の単層小胞が得られる。もう1つの方法は均質化であり、これは剪断エネルギーによって大きなリポソームを小型のものに断片化することに依拠している。典型的な均質化手順では、選択したリポソームサイズ、一般には約0.1~0.5ミクロンの間に至るまで、標準的な乳濁化ホモジナイザーに多重膜小胞を再循環させる。いずれの方法においても、粒径の分布は従来のレーザー光線による粒径の識別によってモニターすることができる。

【0061】

細孔ポリカーボネート膜または非対称性セラミック膜を通してリポソームを押し出すことも、リポソームのサイズを比較的明確に規定されたサイズ分布にまで減少させるための有効な方法である。一般的には、望ましいリポソームサイズの分布が得られるまで、懸濁液を膜に1回または複数回通過させる。リポソームのサイズが徐々に減少するように、連続的に孔径が小さくなる膜を通してリポソームを押し出してもよい。本発明に用いるためのリポソームのサイズは約0.05ミクロン~約0.15ミクロンの範囲であることが好ましい。

【0062】

核酸を含むリポソームが生成された後には、遊離した核酸を除去するために組成物を処理することが好ましい。これは、リポソームに悪影響を及ぼさない任意の適した方法、例えば、リポソームをリン酸緩衝生理食塩水などの適した溶液中で洗浄した後に遠心処理を行うことによって行いうる。このようにして生成された核酸含有リポソームは、直ちに用いてもよく、好ましい条件下、例えば約4℃

で保存してもよい。

【0063】

リポソームが生成された後に、既知の方法によって封入効率を確かめてもよい。例えば、放射標識を施したプラスミドDNA構築物を含むDNA試料を用いることができる。これにより、リポソームに含まれる放射能と遊離放射能との相対量を決定することが可能となる。本方法により、試料中、例えばDNAプラスミドを含む試料中に含まれていた核酸の初期量に対して少なくとも25~50%、より一般的には約70~90%の範囲の核酸封入効率が確実に得られる。

【0064】

共有結合した生体接着分子を有するカチオン性リポソームの調製

生体接着性分子はリポソーム表面の別個の部位に共有結合する。これらの部位の数および表面密度は、リポソーム製剤およびリポソームの種類によって指定されと考えられる。リポソーム表面には非共有性の会合のための部位もあつてよい。リポソームおよび標的部位の生体接着性対応物（生体接着性物質）が生体接着性分子に対して競合することから、非共有結合では投与部位のリポソームから生体接着性分子の解離が生じるおそれがあるため、共有結合は不可欠である。このような解離が起こると、投与した修飾リポソームが通常为非修飾型リポソームに戻り、そのために修飾リポソームの投与の目的が無効になってしまうと考えられる。

【0065】

生体接着性分子とリポソームとの共有結合物を形成させるために、架橋試薬を有効性および生体適合性に関して検討した。架橋試薬には、グルタルアルデヒド（GAD）、二官能性オキシラン（OXR）、エチレングリコールジグリシジルエーテル（EGDE）および水溶性カルボジイミド、好ましくは1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド（EDC）が含まれる。このような架橋物質および使用方法の例は、1997年2月18日に発行された米国特許第5,603,872号に記載されており、これは参照として本明細書に組み入れられる。架橋の複雑な化学反応により、生体接着性分子のアミン残基とリポソームとの結合が確立される。

【0066】

本発明は、カチオン性リポソーム送達装置の表面にある生体接着性分子としての結合型グリコサミノグリカンを提供する。グリコサミノグリカン、特にヒアルロン酸 (HA) はさまざまな生理プロセスにおける役割より、これらは生体接着性分子としての魅力のある候補となっている。グリコサミノグリカン、特にHAは、結合および細胞内への移行にかかわる細胞間相互作用を媒介することが知られている。例えば、HIVは感染するとHAと結合することが知られているため、HAはヒト免疫不全ウイルス (HIV) による哺乳動物細胞の感染に関与する。HA、およびその受容体であるCD44に対するモノクローン抗体はいずれも、単球指向性HIVによる単球のHIV感染を阻害することが見いだされた。レベスク (M. C. Levesque) およびヘインズ (B. F. Haynes)、J. Immunol 156 : 1557~65 (1996)。さらに、グリコサミノグリカンにはほとんど免疫原性がないことが明らかになり、グリコサミノグリカンを認識する抗体もごく少数ながら単離されている。

【0067】

HAは高分子量の直鎖状多糖類としてインビボに存在する二糖類である。HAは哺乳動物の体内では主として結合組織、皮膚、軟骨および関節液中に認められるほか、眼の硝子体の主成分でもある。結合組織では、HAに付随する水和水によって組織間に空隙が生じ、細胞の移動および増殖を誘導する環境が作り出される。HAは細胞運動がかかわる生物現象に重要な役割を果たしており、これには急速発生、再生、修復、胚形成、胚発生、創傷治癒、血管形成および腫瘍形成が含まれる (Toole, Cell Biol. Extracell. Matrix, Hay (編)、Plenum Press, New York、1384~1386 (1991) ; Bertrandら、Int. J. Cancer 52 : 1~6 (1992) ; Knudsonら、FASEB J. 7 : 1233~1241 (1993))。HAレベルは腫瘍の侵略度と関連することが示されており (Ozelloら、Cancer Res. 20 : 600~604 (1960) ; Takeuchiら、Cancer Res. 36 : 2133~2139 (1976) ; Kimataら、Cancer Res. 43 : 1347~1354 (1983))、腫瘍細胞の浸潤特性の指標になる可能性がある。クヌッパー (M. M. Knupfer) ら、Anticancer Res 18 : 353~6 (1998)。

【0068】

複数のグループが、HAの受容体としてCD44を同定した (例えば、Aruffoら、Cell, 61 : 1303 (1990) ; Lesleyら、Exp. Cell. Res.、187 : 224 (1990) ; Miyak

eら、J Exp. Med.、172 : 69 (1990) ; Cultyら、J. Cell Biol.、111 : 2765 (1990) を参照)。CD44は細胞表面糖蛋白質のファミリーであり、選択的スプライシングおよび翻訳後修飾によって生成される。CD44の種々のイソ型は、T細胞およびB細胞、顆粒球、単球、マクロファージおよびLCを含むDCなどの多くの細胞種によって発現される。1996年には、白血球のホーミングの際におこる多くのプロセスの1つである、内皮細胞上の白血球の転がり現象 (rolling) をHA-CD44相互作用が媒介することが報告された (例えば、DeGrendeleら、J. Exp. Med.、111 : 2765 (1996) ; Clarkら、J. Cell Biol.、134 : 1075 (1996))。HA-CD44相互作用は今では、白血球のホーミング、腫瘍転移、組織発生、造血、サイトカイン生成、T細胞活性化およびアポトーシスを含む、多くの生理的および病理的現象を媒介することが知られている。

【0069】

その他の分子もグリコサミノグリカンとの生体接着性分子として役立ち、リポソームを特定の細胞集団に結合させるのに役立つと思われる。このような因子は標的細胞上の細胞表面分子と特異的に結合する。生体接着性分子には、EGF、FGF、VEGF、インスリンなどの増殖因子、IL-1~IL-18、特にIL-2、IL-4、IL-12およびIL-18を含むインターロイキン；IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ などのインターフェロン；ケモカイン；TNF- α 、TGF β などのサイトカインが非制限的に含まれる。

【0070】

本発明のリポソームの使用

生体接着性リポソーム中に封入された核酸には、本開示を読むことによって当業者に明らかとなるように、多くのさまざまな用途があると考えられる。例えば、生体接着性リポソーム中に封入された核酸は、1つまたは複数の欠損遺伝子を発現する細胞または動物を作出するために用いることができる。この結果得られた細胞または動物は、候補治療薬の有効性を評価するためのインビトロまたはインビボのモデルとして用いられうる。

【0071】

本発明のリポソーム中に封入された核酸のさらに別の用途は、治療用産物をコードする、または内因性産物の転写を妨げる、DNAまたは構築物を細胞に導入す

ることである。治療用産物は、例えば、アンチセンスRNAもしくはリボザイムRNA分子でもよく、または治療用蛋白質でもよい。本明細書で用いる「治療用蛋白質」という用語は、宿主に投与した場合または宿主の細胞内で発現された場合に治療上の利点をもたらす、ペプチド、ポリペプチドまたは蛋白質のことを指す。核酸の送達は、リポソーム中に封入されたDNA構築物を宿主動物、好ましくはヒトに直接導入するインビボでのものでもよく、単離した細胞にリポソーム中に封入されたDNA構築物をまずトランスフェクトし、その後に宿主動物に再び導入するエキスビボでのものでもよい。ヒトにおけるエキスビボ核酸送達は米国特許第5,399,346号に記載されており、これは参照としてその全体が本明細書に組み入れられる。また、核酸送達に関する一般的な総説については、同じく参照としてその全体が本明細書に組み入れられる、トルストシェフ (Tolstoshev) (1993)、Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.、33:573~96も参照されたい。

【0072】

本発明のリポソームの薬学的製剤

本明細書で説明した生体接着性カチオン性リポソームは、従来の抗生物質を投与するために用いられる事実上あらゆる手段によって被験者に投与しうる。生体活性化合物の動物への送達に関する技術分野では種々の送達系が周知である。これらの系には、静脈内または筋肉内または気管内注入、点鼻薬、吸入用エアロゾル、および経口投与または坐薬投与が非制限的に含まれる。用いる具体的な送達系は治療しようとする領域の位置に依存しており、位置の決定および適切な送達系の選択を行うことは当業者の技能の範囲に十分に含まれる。1つの好ましい態様では、リポソーム組成物を肺への導入を介して送達し、より好ましくは生体接着性カチオン性リポソームをエアロゾル吸入装置を用いて患者に投与する。

【0073】

1つの特に好ましい態様では、本発明の製剤を、エアックス (AERx) 装置 (Ara digm, Hayward, CA) などの携帯型で手持ち式の電池駆動式装置を用いて患者に投与することが好ましい。または、本発明の製剤を、機械的 (電子的でない) 装置を用いて投与することも可能と思われる。用いられうる具体的な装置の詳細は、1999年8月13日に発行された米国特許第5,544,646号、および1995年4月11日に

発行された米国特許第5,404,871号に開示されており、これらはいずれも参照として本明細書に組み入れられる。

【0074】

エアロゾルは膜の細孔に薬剤を強制通過させることによって生成でき、細孔のサイズの範囲は約0.25～6ミクロンである。細孔がこのサイズである場合、細孔を通過してエアロゾルとなる粒子の直径は0.5～12ミクロンの範囲と考えられる。薬剤粒子は、粒子をこの範囲に保つための気流を用いて放出させるとよい。小型粒子の生成は、約800～約4000kHzの範囲の振動周波数が得られる振動装置を用いることによって容易になると思われる。当業者は、直径が約0.5～12ミクロンの範囲にあるエアロゾル化された粒子を得ることが目的であることに留意しながら、薬剤が放出される細孔のサイズ、振動周波数、圧力、ならびに製剤の密度および粘度に基づく他のパラメーターなどのパラメーターに対してある程度の調整を加えうることを認識すると考えられる。

【0075】

本発明の製剤は、患者の肺表面を通過して循環系へと向かうリポソームの輸送を促進するのに有効な肺胞界面活性物質蛋白質の一定量との生体接着性カチオン性リポソームの組み合わせを含みうる。例示的な製剤は、1991年4月9日に発行された米国特許第5,006,343号に開示されており、これは肺内送達に用いられるリポソームおよびリポソームの製剤を開示する目的で参照として本明細書に組み入れられる。

【0076】

リポソーム製剤が低粘度の液体製剤であってもよい。薬剤単独または担体と組み合わせた場合の粘度は、好ましくは粒径が約0.5～12ミクロンの範囲にあるエアロゾルを生成するために、例えば20～200psiを用いて、開口部から製剤を強制排出させてエアロゾルが生じうる程度に十分に低い必要がある。

【0077】

1つの態様においては、沸点が低い揮発性の高い噴霧剤を、本発明のリポソームおよび薬学的に許容される賦形剤と配合する。リポソームは懸濁液または乾燥粉末として供給可能であり、または、別の態様では、リポソームを噴霧剤中の溶

液に溶解する。これらの製剤はいずれも、唯一の開口部として弁が1つある容器内に容易に収めることができる。噴霧剤は揮発性が高い、すなわち、沸点が低いため、容器の内容物には圧力がかかると考えられる。

【0078】

もう1つの製剤によれば、生体接着性カチオン性リポソームを乾燥粉末単独で供給し、さらにもう1つの製剤によれば、生体接着性カチオン性リポソームを溶液製剤として供給する。乾燥粉末は、各々の送達に関して計測した一定の吸気流量および吸気量のみで吸入を行うことによって直接吸入することが可能と思われる。しかし、粉末を水性溶媒中に溶解して、吸入用のエアロゾルを生成するための多孔膜を通過する溶液を作る方が好ましい。

【0079】

吸入および肺内経路を介して患者に送達することができるエアロゾル形態の生体接着性カチオン性リポソームを生成しうる任意の製剤を、本発明と組み合わせる用いることができる。エアロゾル化された送達装置と組み合わせる用いられる製剤に関する詳細な情報は、「レミントンの製薬科学 (Remington's Pharmaceutical Sciences)」、ジェンナーロ (A.R. Gennaro) 編 (最新版)、Mack Publishing Companyに記載されている。インスリン製剤に関しては、シアーラ (Sciarra) ら (1976)、Journal of Pharmaceutical Sciences、第65巻、第4号を参照することも有用である。低沸点噴霧剤を用いる場合には、装置の加圧缶の内部に噴霧剤を保ち、液体状態で維持する。弁を作動させると噴霧剤が放出され、有効成分が噴霧剤とともに缶から強制放出される。噴霧剤は周期の大気に曝露されると「フラッシュする (flash)」、すなわち噴霧剤は直ちに気化すると考えられる。フラッシングは急速に起こるため、患者の肺に実際に送達されるのは本質的には純粋な有効成分である。

【0080】

経口投与用の剤形として組成物を調製する際には、通常の医薬用媒体の任意のものを用いてよく、これには例えば、経口用液体製剤 (例えば、懸濁剤、エリキシル剤および液剤など) の場合には水、グリコール、油、アルコール、着香料、保存料、着色剤など；または、経口固形製剤 (例えば、粉剤、カプセル剤、錠剤

など)の場合にはデンプンなどの担体、糖、希釈剤、顆粒化剤、潤滑剤、結合剤、崩壊剤などがある。投与が容易であるため、錠剤およびカプセル剤が最も有益な経口投与剤形であり、この場合には固形の医薬用担体が明らかに用いられる。必要に応じて、標準的な技術によって錠剤に糖衣および腸溶性コーティングを施してもよい。

【0081】

注射による非経口的適用のための製剤は、薬学的に許容される形態のリポソームに適した溶液中に含みうる。適切な液体担体、懸濁剤、等張性を調整するための薬剤、保存料などを用いて注射用懸濁液を調製することもできる。非経口的に投与しうる組成物を調製するための実際の方法、および被験者への投与のために必要な調整は、当業者には知られている、または明らかであると考えられ、その詳細は例えば、「レミントンの製薬科学 (Remington's Pharmaceutical Science)」、第15版、Mack Publishing Company、Easton、PA (1980) に記載されており、これは参照として本明細書に組み入れられる。

【0082】

局所投与のための担体は製剤に応じて多岐にわたる形態をとることができ、これにはクリーム剤、ドレッシング剤、ゲル剤、ローション剤、軟膏または液剤であつてもよい。

【0083】

坐薬は、リポソームをカカオ脂、カカオバター、グリセリン、ゼラチンまたはポリエチレングリコールなどの液体媒体と混合することによって調製する。

【0084】

治療的に用いられる組成物の有効量は、例えば、治療の目的、投与経路および患者の状態に依存すると考えられる。したがって、最適な治療効果が得られるように、医師が投与量を微調整し、投与経路を修正することが必要であると考えられる。

【0085】

薬剤製剤の形態にかかわらず、吸入用のリポソーム粒子は約0.5~12ミクロンの範囲となるように作ることが好ましい。サイズが比較的狭い範囲にあるリポソ

ーム粒子を作ることにより、薬剤送達系の効率をさらに高め、投薬の再現性を改善することが可能である。このため、粒径が0.5～12ミクロンの範囲にあるだけでなく、患者に送達される粒子の80%またはそれ以上の粒径が平均粒径の±20%以内、好ましくは±10%以内、より好ましくは平均粒径の±5%以内となるように、平均粒径が狭い範囲に収まっていることが好ましい。

【0086】

さらに、本発明に係るリポソームを、特定の障害の治療に用いるのに適した他の医薬品と併用してインビボに投与してもよい。例えば、リポソームが、標的細胞に特定薬剤に対する感受性を付与する「自殺遺伝子」を含む場合には、リポソームをその薬剤と同時投与することが望ましい場合がある。薬剤はリポソーム中に封入してもよいが、必ずしもそうする必要はない。

【0087】

投薬

男性の治療に関して提案する有効化合物の1日投与量は約0.5mg DNA/kg～4mg DNA/kgであり、これを1日1回または2回投与することが好都合と思われる。用いる正確な用量は当然ながら、患者の年齢および状態、ならびに投与経路に依存すると考えられる。すなわち、吸入による投与のための適した用量は約0.5mg DNA/kg～2mg DNA/kgであり、経口投与の場合は約2mg DNA/kg～5mg DNA/kgであり、非経口投与の場合は約2mg DNA/kg～4mg DNA/kgである。

【0088】

これらのリポソームは、インビトロまたはインビボの双方で標的細胞への核酸のトランスフェクションに用いられうる。標的細胞は、細胞膜が脂質二重層からなる任意の細胞であってよく、これには一般に真核細胞、好ましくは哺乳動物細胞、より好ましくはマウス細胞またはヒト細胞が含まれる。

【0089】

トランスフェクションをインビトロで行う場合には、適量の主題リポソームを、標的細胞を含む細胞培養用培地に添加する。リポソーム組成物の適量は、細胞 10^6 個当たりリポソームが約0.12～1.2mgの範囲、または細胞 10^6 個当たり封入DNAが約0.1～約10 μ gの範囲でよい。しかし当業者は、特定の標的細胞の不安定性

、トランスフェクションに対する耐性、リポソームがより小さな核酸を含むかより大きな核酸を含むか、特定の遺伝子の活性および望ましい遺伝子発現レベルなどの要因にこの量が依存し変化することを理解すると考えられる。

【0090】

この結果得られる、リポソームにトランスフェクトした細胞はさまざまな用途に用いられうる。例えば、取り込まれた核酸によってコードされるポリペプチド、例えば、望ましい哺乳動物遺伝子産物を発現させるために細胞を用いてもよい。また、取り込まれた核酸によって特定の遺伝的欠陥を発現する細胞が生じる場合には、その特定の遺伝的欠陥に対して提唱された治療法の有効性を調べるためのモデルとして細胞を用いることができる。または、インビトロでのリポソームトランスフェクションにより、何らかの遺伝的欠陥を代償する遺伝子、またはアンチセンスRNA、リボザイムもしくは治療用蛋白質などの部分をコードする遺伝子が組み入れられる場合には、遺伝子治療を必要とする宿主にこれらの細胞を投与してもよい。米国特許第5,399,346号を参照されたい。

【0091】

核酸を含むリポソームをインビボで用いようとする場合には、このような治療を必要とする宿主にそれらを投与する。インビボでの使用に関する別の変法は、疾患の研究に有用なトランスジェニックマウスまたは「ノックアウト」マウスなどの遺伝的欠陥の作製を目的とする。患者における治療の一例は、ナーベル (Nabel) ら (1993)、Proc. Natl. Acad. Sci., 90:11307に記載された通り、ヒト白血球抗原B7 (HLAB7) をコードするDNA構築物を前記のリポソーム中に封入し、皮膚黒色腫に罹患した患者の腫瘍病変に直接注射する場合のものであり、この文献はその全体が参照として本明細書に組み入れられる。HLAB7は黒色腫細胞に対する宿主免疫応答を刺激する。

【0092】

一般に、インビボでのリポソームの投与量は約0.2~20mg/kg体重、好ましくは約2mg~10mg/kg体重の範囲であると考えられる。この量は当然ながら、具体的な遺伝的欠陥、封入する核酸の種類、望ましい遺伝子発現レベル、リポソーム中に含まれる核酸の量、および前記の他の要因に依存すると考えられる。

【0093】

インビボまたはインビトロでのトランスフェクションの効率は標準的な方法によって測定しうる。サムブルック (Sambrook) ら (1989)、「分子クローニング：実験マニュアル (Molecular Cloning: a Laboratory Manual)」、第2版、コールド スプリング ハーバー 研究所 (Cold Spring Harbor Laboratory)、Cold Spring Harbor, N.Y. を参照のこと。例えば、細胞にインビトロでトランスフェクトされたリポソーム中に封入されたDNA構築物にコードされる遺伝子の発現を、RNA転写物の生成を測定するためのノーザンブロット法またはRNA PCR法によって、および蛋白質の生成を検出および測定するためのウェスタンブロット法、免疫沈降およびインサイチュー免疫組織化学によって検討することができる。宿主細胞染色体へのDNAの組み込みはPCRまたはサザンブロット法によって判定しうる。同じ方法は、インビボで治療した組織がトランスフェクトされた遺伝子を含むか否か、またはトランスフェクトされた遺伝子の遺伝子産物を発現するか否かの判定にも用いられる。これは、関心対象の組織の生検試料を用いて行うことが好ましい。

【0094】

実施例

以下の実施例は、本発明の作成法および使用法に関する完全な開示および説明を当業者に提供するために記載されており、発明とみなしているものの範囲を制限するものではない。使用する数字（例えば、量、温度、濃度など）に関して正確であるように努力は払っているが、ある程度の実験的誤差および偏差は許容されるべきである。別に特記しない限り、各部分は総重量に占める部分重量であり、分子量は平均分子量であり、温度は摂氏温度で示され、圧力は大気圧またはほぼ大気圧である。

【0095】

実施例1：DNAが封入されたカチオン性リポソームの調製

DOTMA、N-[1-(2,3-ジオレイロキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド、およびDOPE、ジオレイルホスファチジルエタノールアミンをDOPE/CH EMS 1:1のモル比で含むリポソームを調製する。まず50mgの総脂質を無水クロロ

ホルム中に溶解し、続いて丸底フラスコ内で乾燥させて薄膜とする。次に脂質を激しく攪拌することによって2.5mlの脱イオン水中に懸濁する。続いて懸濁液をpH 8に調整し、水浴型超音波処理器で超音波処理を5分間行う。この結果得られたリポソームのサイズ分けを光散乱によって行い、 $0.45\mu\text{m}$ フィルターを通す濾過によって滅菌する。DNA／ポリリジンの重量比が1 : 0.75となるように、 $400\mu\text{L}$ の脱イオン水に溶解した $36\mu\text{g}$ のポリ-L-リジンを、 $400\mu\text{L}$ の脱イオン水に溶解した $48\mu\text{g}$ のプラスミドDNAと急速混合する。この結果得られたDNA／ポリリジン複合体のアリコート、等量の脱イオン水中にある種々の量のカチオン性リポソームと急速混合する。プラスミドDNAおよびポリリジンを急速に混合すると緻密な複合体が形成された。全体的な電荷が正であっても負であってもこれらの複合体は安定である。

【0096】

DNA／ポリリジン (1 : 0.75) 複合体は、DOTMA、N-[1-(2,3-ジオレイロキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド、およびDOPE、ジオレイルホスファチジルエタノールアミンによるリポソームと急速混合すると自然に封入される。DNAを含むリポソームのサイズは、DNA／ポリリジン複合体とカチオン性リポソームとの荷電比に依存する。

【0097】

実施例2：生体接着性分子の共有結合

HAの水溶液を、水溶性カルボジイミドEDCとのインキュベーションによってあらかじめ活性化しておく。成分を混合し、HAおよびEDCをそれぞれ最終濃度 1.7mg/ml として含む調製系を作る。 1N HCl による滴定を行って調製系のpHを3に調整した。調製系を攪拌しながら 37°C で3時間インキュベートする。

【0098】

プレインキュベーション期間の後に、実施例1の通りに作製した試料を添加し、続いてpH 8.5の 0.1M ホウ酸緩衝液を添加する。このリポソーム混合物を振盪浴中にて 37°C で24時間インキュベートする。超遠心および洗浄によって余分な未結合同型HAおよび試薬を除去した。

【0099】

実施例3：エアックス（AERx）エアロゾル化装置からのDNA／脂質製剤の放出量は電解質濃度に伴って増加する

エアックス（AERx）エアロゾル化装置を用いて、種々の塩濃度のDNA／脂質製剤の放出量を検討した。エアックス（AERx）エアロゾル化装置は7×20個のノズルアレイ、60 LPM、SDP（単回投与プラットフォーム）クランプを有する。塩濃度が0%、0.05%および0.1%のDNA／脂質製剤を検討した。その結果を図1に示す。この結果は、塩濃度の上昇に伴ってDNA／脂質製剤の放出量が増えることを示している。ED：放出量；%LC：剤形中の放出された有効物質が総量に占める割合

。

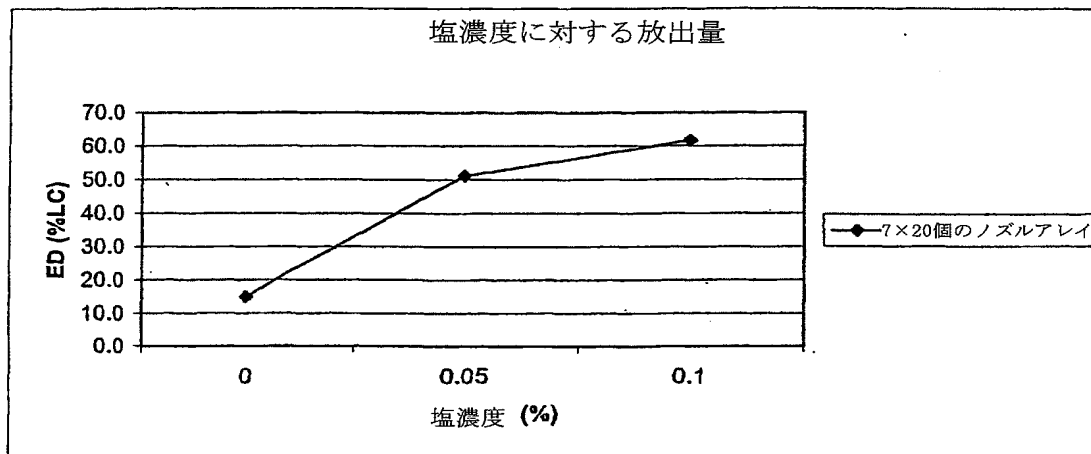
【0100】

本明細書では、本発明を、最も実践的かつ好ましい態様と思われる形で示し、説明してきた。しかし、それからの逸脱も可能であり、これは本発明の範囲に含まれること、および、本開示を読むことによって当業者には明らかな変更が想定されることは認識されると思われる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 DNA／脂質製剤の放出量に対する塩濃度の影響を示したグラフである。

【図1】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US01/10625

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) A61K 9/127 US CL 424/450; 985/54 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/450; 985/54 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched NONE Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Extra Sheet.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,853,752 A (UNGER et al) 29 December 1998, abstract, col. 20 line 63 through col. 22, line 17, col. 25, lines 23-34, col. 28, lines 11-25, col. 32, line 60 through col. 33, line 10, col. 35, lines 32-68 and claim 49.	1-20
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
25 JUNE 2001		06 AUG 2001
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-5230		Authorized officer GOLLAMUDI S. KISHORE Telephone No. (703) 305-1200

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1999)*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US01/10625

B. FIELDS SEARCHED

Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

WEST:

search terms: glycosaminoglycans, hyaluronic, chondroitin, keratan, chitin, liposomes, complexes, covalent, transfection, pulmonary, inhalation.

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テームト* (参考)
A 6 1 K 47/18		A 6 1 K 47/18	4 G 0 0 5
47/36		47/36	
47/44		47/44	
47/48		47/48	
A 6 1 P 5/00		A 6 1 P 5/00	
37/00		37/00	
43/00	1 0 1	43/00	1 0 1
	1 0 5		1 0 5
	1 1 1		1 1 1
B 0 1 J 13/04		C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 N 15/09		B 0 1 J 13/02	A
// C 1 2 N 5/10		C 1 2 N 5/00	B
(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, G M, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, B Z, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, I S, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, P T, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW			

F ターム(参考) 4B024 AA01 CA01 DA03 EA10 FA20
GA13 HA17
4B065 AA93X AB01 AC20 BA05
BD38 BD50 CA24 CA44
4C076 AA19 AA24 AA25 AA93 AA95
BB27 BB32 CC09 CC15 CC29
CC41 CC42 DD19E DD49
DD63 EE37 EE41 EE57 EE59
FF15 FF16 FF68 GG46
4C084 AA13 MA01 MA05 MA24 MA55
NA02 NA10 NA13 NA15 ZB011
ZB021 ZB211 ZB212 ZC021
ZC412
4C086 AA01 EA16 MA02 MA03 MA05
MA13 MA24 MA56 NA02 NA10
NA13 NA15 ZB01 ZB02 ZB21
ZC02 ZC41
4G005 AA07 BA20 BB15 BB20 BB24
DB01Z DB12Z DC28X DC42X
DC56X DE08X EA03